

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ : 住友ベークライト) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し, 3 日間培養した。培養終了後, 14.8.6. に記載する割合で溶媒, 被験物質および陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後, 各プレートの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え, さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し, 3 日間培養した。培養終了後, 14.8.6. に記載する割合で溶媒, 被験物質および陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は 14.8.3. に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し, 3 日間培養した。培養終了後, 14.8.6. に記載する割合で溶媒, 被験物質および陽性対照物質の処理を行い, さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	溶媒/被 験物質液	培養液	S9 mix	陽性対照 物質液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に, 最終濃度で $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1252976, Invitrogen) を添加し, 細胞分裂を中期で停止させた。次いで, 培養液を遠心管に全量移した後, 0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1263419, Invitrogen) を用いてプレートから細胞を剥離し, 遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後, 37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え, 37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後, 氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2

回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を1枚作製した。その後、染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を1滴滴下し、染色体標本を2枚作製した。スライド標本を十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8 : Lot No. TP601474, Merck) を用いて希釈した1.2%ギムザ染色液 (Lot No. OB318388, Merck) で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 細胞増殖抑制制度の測定

染色体標本作製時に、陰性対照群、各被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスターC-100LU, キッコマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を 50 μ L 添加し、攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を 100 μ L 分注し、ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250, キッコマン) の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量 (Relative Light Unit ; RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

14.8.10. 評価対象

観察用量としては、細胞増殖抑制試験および 14.8.9. の相対細胞増殖率がいずれの処理群においても 50% 以上であったことから、試験した最も高い用量を最高用量とした。いずれにおいても連続する 3 用量を評価対象とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。始めに短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陰性結果が得られたため、引き続き連続処理法の標本についても観察を行った。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 ($\times 600$) で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色分体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも5%未満であること。陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞については異常細胞数に含めないで判定した。

異常細胞の出現頻度を、Fisherの直接確率計算法(有意水準片側2.5%)を用いて検定した。また、用量依存性については、Cochran Armitageの傾向検定(有意水準片側2.5%)を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した。

短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、いずれの被験物質処理においても、細胞生存率は陰性対照群の80%以上を示したことから、50%細胞増殖抑制濃度は算出できなかった。

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理の393 µg/mL以上の用量において油滴状の析出物が認められた。被験物質処理終了後、析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は、393 µg/mL で2.0%、785 および1570 µg/mL で0.0%を示し、陰性対照群(0.5%)と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、393 µg/mL で0.0%、785 および1570 µg/mL で0.5%を示し、陰性対照群(0.0%)と同等であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は42.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 393 および 785 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%, 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.0% を示し, 陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は, 393 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%, 785 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.0%, 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5% を示し, 陰性対照群 (0.5%) と同等であった。

一方, 陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 24.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 393, 785 および 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0% を示し, 陰性対照群 (1.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は, 393 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%, 785 および 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0% を示し, 陰性対照群 (1.0%) と同等であった。

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 24.5% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時, 全ての処理の 393 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量において油滴状の析出物が認められた。被験物質処理終了後, 析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

16. 考察および結論

2-ethylhexyl vinyl ether の変異原性, すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため, 培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に, 短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理ではガイドライン上定められた最高用量である 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10 mM 相当) まで検討した。

その結果, 2-ethylhexyl vinyl ether 処理群の場合, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても染色体異常の誘発頻度は陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体構造異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果, いずれの用量においても明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

本被験物質 2-ethylhexyl vinyl ether についての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。

類縁体すなわち、異性体である hexanol, 2-ethyl-および ethylhexyl acrylate の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告もなかった。

なお、陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において 2-ethylhexyl vinyl ether のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

17. 参考とした資料

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. *Chemical Mutagens*. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat Res* 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 269-275.

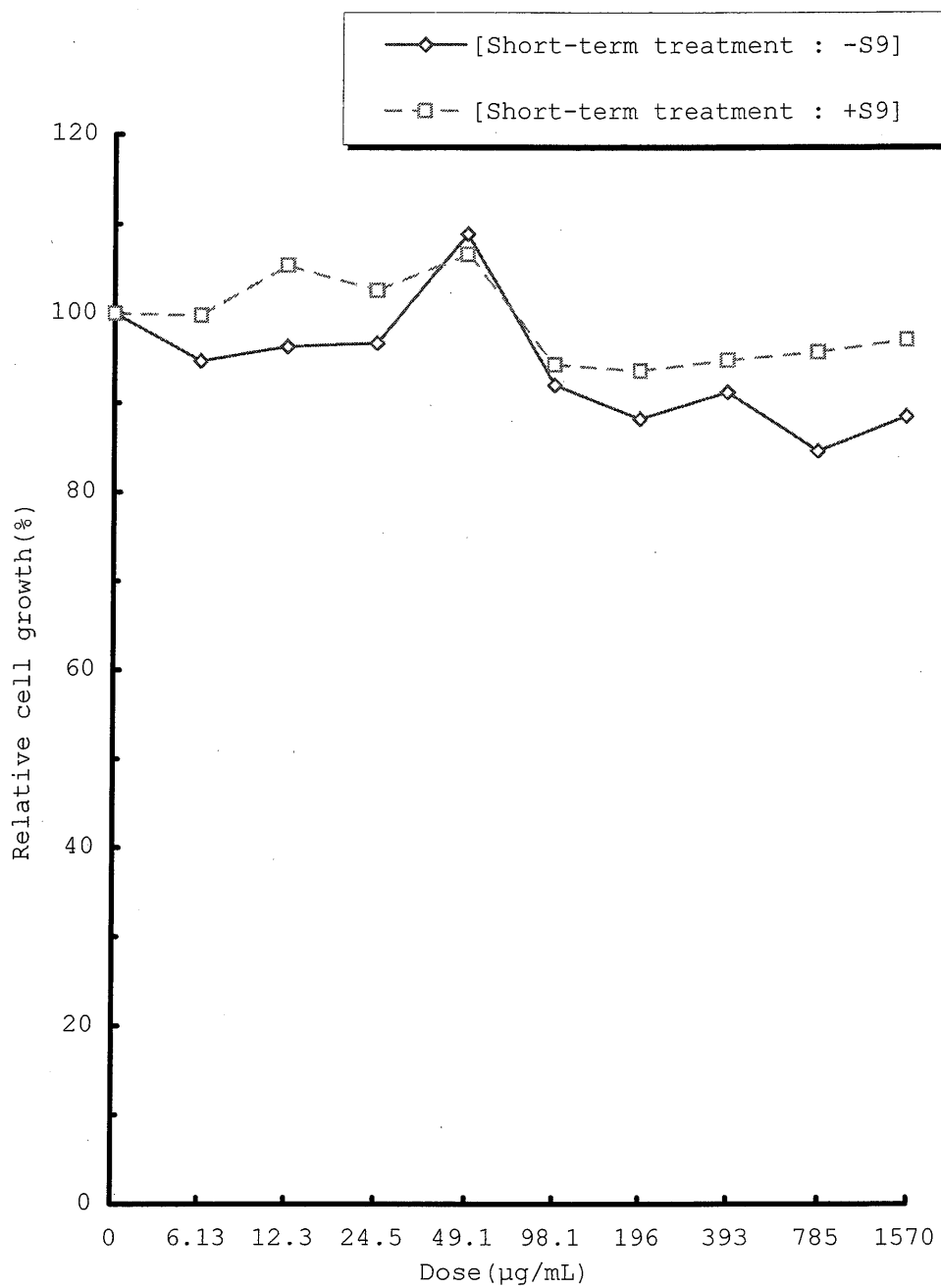


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment]

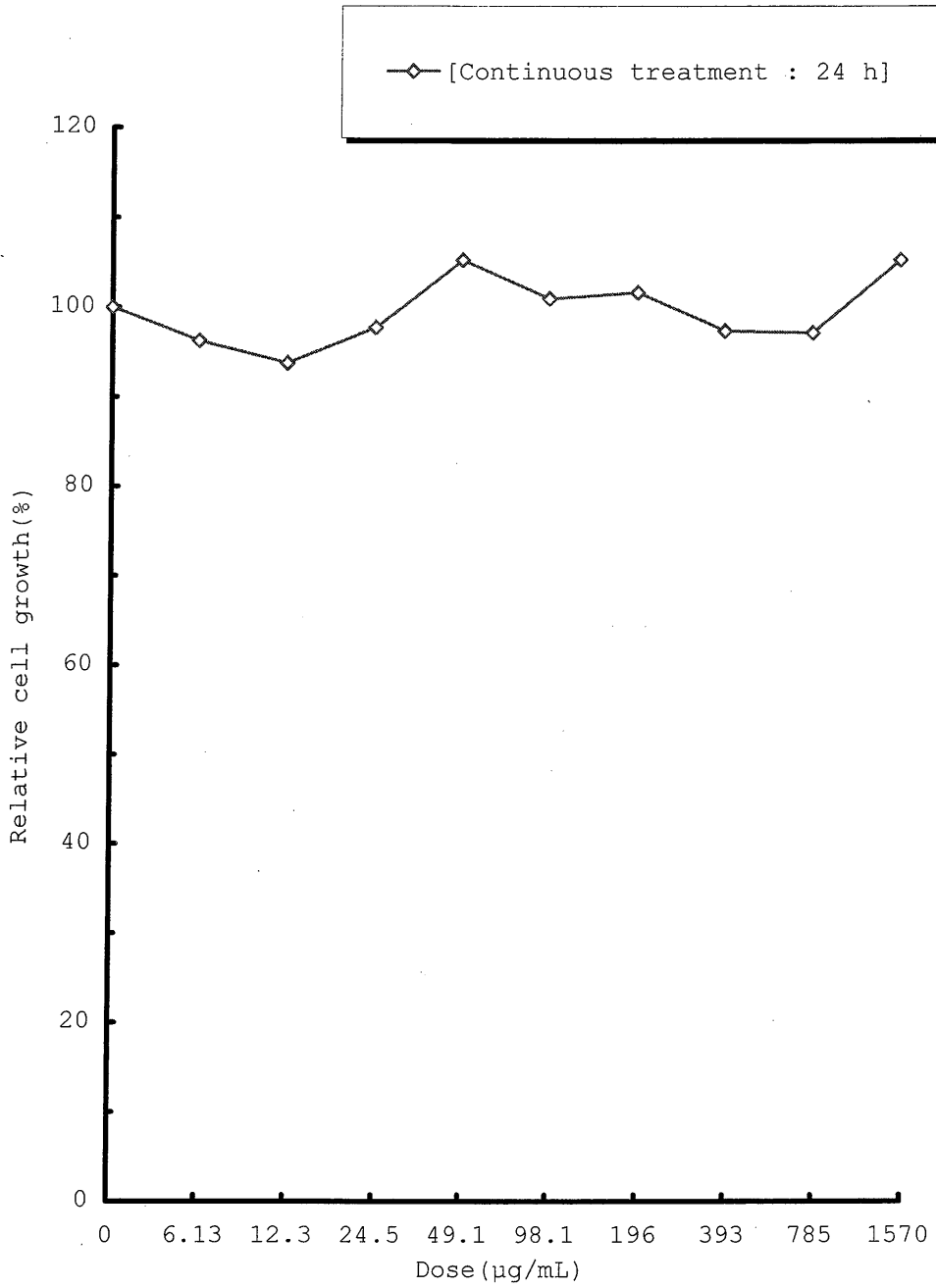


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Continuous treatment]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment]

Exp. No. 9047 (115-198)

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	6.13	94.3 95.0	[94.7]		6.13	99.8 99.8	[99.8]
	12.3	93.5 99.2	[96.4]		12.3	106.2 104.5	[105.4]
	24.5	97.9 95.5	[96.7]		24.5	103.4 101.7	[102.6]
	49.1	108.2 109.6	[108.9]		49.1	104.1 109.1	[106.6]
	98.1	90.4 93.6	[92.0]		98.1	94.6 93.9	[94.3]
	196	90.6 85.7	[88.2]		196	93.9 93.2	[93.6]
	393	93.6 88.8	[91.2]		393	99.0 90.6	[94.8]
	785	84.0 85.2	[84.6]		785	96.6 94.8	[95.7]
1570	87.4 89.5	[88.5]	1570	99.5 94.6	[97.1]		

50% Growth inhibition dose was as follows:
[short-term treatment : -S9] ——— Not inhibited
[short-term treatment : +S9] ——— Not inhibited
a): Negative control(Dimethyl sulfoxide,10 µL/mL)

Table 2. Results of growth inhibition test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Continuous treatment]

Exp. No. 9047 (115-198)

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	6.13	94.7 97.9	[96.3]
	12.3	94.0 93.5	[93.8]
	24.5	98.5 97.2	[97.9]
	49.1	99.6 110.9	[105.3]
	98.1	99.3 102.7	[101.0]
	196	101.8 101.5	[101.7]
	393	98.2 96.6	[97.4]
	785	103.8 90.6	[97.2]
	1570	106.5 104.0	[105.3]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] ——— Not inhibited
a): Negative control(Dimethyl sulfoxide:10 µL/mL)

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	393	6	89.9	200	3	1	3	0	0	0	4 (2.0)	200	0 (0.0)
	785	6	95.9	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	1570	6	85.7	200	5	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
MMC b)	0.1	6	78.6	200	16	33	67	0	0	0	84 (42.0) *	200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control(Mitomycin C)

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	393	6	87.0	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	785	6	89.4	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	2 (1.0)
	1570	6	90.0	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	1 (0.5)
CP b)	12.5	6	89.0	200	5	8	43	0	0	0	48 (24.0) *	200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

b): Positive control (Cyclophosphamide)